

氟化物对桑蚕幼虫中肠 ATP 酶活性 影响的电镜细胞化学定位*

陈玉银 包焕盛 吴玉澄

(浙江农业大学 杭州 310029)

桑蚕 *Bombyx mori* (L.) 氟中毒导致蚕茧严重减产是目前蚕业界最为关切的问题, 有关桑蚕幼虫氟中毒的机理研究也从各方面展开^[1]。已知桑蚕氟中毒与组织细胞中的能量代谢有关^[2] 氟能抑制桑蚕幼虫血液及中肠腺苷三磷酸酶(ATPase)的活性^[3]。中肠是幼虫消化吸收的重要场所, 也是氟攻击的首要器官, 因此, 研究氟对中肠 ATP 酶活性的作用对阐明桑蚕幼虫氟中毒机理具有非常重要的意义。本文应用电镜细胞化学技术, 通过添食梯度浓度的氟化钠处理的桑叶, 从亚细胞水平研究氟对桑蚕幼虫中肠 ATP 酶活性分布的影响。

1 材料与方法

1.1 蚕品种

桑蚕原种杭 8, 对氟极为敏感。

1.2 氟添食桑叶的处理

配制系列氟化钠溶液如下: 0 mg /kg, 20 mg /kg, 80 mg /kg, 120 mg /kg, 320 mg /kg, 桑叶浸渍 10 min 后捞起, 自然凉干后备用。实测桑叶含氟量为: 18.7 mg /kg, 47.6 mg /kg, 99.2 mg /kg, 158.9 mg /kg, 359.4 mg /kg。

1.3 ATP 酶的细胞化学定位

5 龄起蚕添食经氟化钠浸渍的桑叶, 12 h 后幼虫活体解剖, 剖开腹部后马上滴上用 0.1 mol /L 二甲砷酸钠配制的 2% 甲醛和 2.5% 戊二醛的混合固定液(pH 7.2), 取出第一腹节至第五腹节的中肠, 在固定液中切成 1~2 mm 的小块, 放入样品瓶内 4℃ 下固定 1 h, 用二甲砷酸钠缓冲液清洗 1 h(中间换液 4 次), 然后用象山 ZQP-86 型振动切片机切成 50 μm 厚的厚切片, 此厚切片在 pH 7.2 的 0.1 mol /L Tris- 顺丁烯二酸缓冲液中冲洗 2 h, 然后用以下培育液进行培育^[4]。50 mmol /L Tris- 顺丁烯二酸缓冲液(pH 7.2)中含, 2 mmol /L 底物(ATP 钠盐), 5 mmol /L MgSO₄, 3 mmol /L Pb(NO₃)₂。对照: ① 上述培育液中减去底物; ② 上述培育液中加入 0.01 mol /L 氟化钠。培育过程在 37℃ 下 1.5 h, 然后切片在重蒸水中冲洗 3 h。后固定用 2% 的四氧化锇(用 pH 7.2, 0.1 mol /L 二甲砷酸钠缓冲液配制), 在 4℃ 冰箱固定过夜。梯度丙酮脱水, Epon 812 包埋, 包埋块在 Reichert Jung ULTRACUT E

* 瑞典国际科学基金(IFS)资助项目

1995-07-29 收稿, 1996-03-06 收修改稿

型超薄切片机上切成 70 nm 的超薄片, 超薄片在 JEM-1200EX 透射电子显微镜下观察, 拍照。工作电压 60 kv。

2 结果与分析

2.1 氟对 5 龄蚕中肠细胞内 ATP 酶亚细胞分布的影响

试验在春蚕期进行, 桑叶自然含氟量很低, 只有 18.7 mg/kg, 对抗 8 也是绝对安全的氟浓度。为了清楚看出酶活性定位的分布, 防止电子染色过程造成的污染及人工假像, 电镜观察的超薄切片除不经酶活性定位的对照(图版 I: 1, 图版 II: 7)外, 全部未经电子染色直接在电镜下观察, 所以超微结构反差较低, 但与酶活性反应对照处理的结构观察相比较, 要确认 ATP 酶定位的细胞器并不困难。在电子显微镜下的观察结果表明, ATP 酶活性反应生成的磷酸铅沉淀物, 在细胞内一定部位的表现界限分明, 没有发生反应产物的扩散现象; 同时在两种对照切片中基本上没有铅沉淀物(图版 I: 1, 图版 II: 7), 这表明反映在照片上的结果是可靠的。

在正常的氟化物浓度下(桑叶含氟 18.7 mg/kg), 中肠细胞中的 ATP 酶主要分布在圆筒形细胞的绒毛上(图版 I: 2)和包围在中肠外围肌肉的质膜上(图版 II: 8)。而细胞核内、核膜、细胞质、大多数细胞的质膜、细胞器以及杯形细胞的绒毛状突起上都未见酶活性反应。在含大量脂质小球的一种特殊的圆筒形细胞中也未有酶活性反应(图版 II: 10, 11)。在桑叶中氟浓度为 47.6 mg/kg 时, 对中肠细胞的超微结构尚无明显影响, 对总 ATP 酶活性的测定表明并无明显的下降, 但氟对 ATP 酶的活性影响已在亚细胞分布上表现出来。首先, 在含有大量高电子密度脂质小球的圆筒形细胞的细胞质膜上出现活性很强的 ATP 酶分布, 并且在细胞质中也可见细小的沉淀颗粒分布(图版 II: 12, 13)。圆筒形细胞的绒毛上仍保持很强的酶活性, 同时在靠近绒毛处细胞质中的内质网及线粒体上也出现较强的酶活性反应(图版 I: 3)。而在底膜面肠壁肌质膜上的 ATP 酶活性已经明显下降(图版 II: 9), 且在内褶的细胞质膜上出现较多的 ATP 酶活性反应。一般在杯形细胞的绒毛状细胞质突起上没有酶活性分布, 但在少数细胞观察到大颗黑色沉淀颗粒, 且在绒毛内的线粒体上有大量细小的沉淀存在(图版 III: 16)。当桑叶中氟浓度达到 99.2 mg/kg 时, ATP 酶活性及亚细胞分布已受到严重影响。圆筒形细胞绒毛上的酶活性降低, 反应沉淀颗粒显著减少, 而在细胞内缘的细胞器膜上出现较强的酶活性反应(图版 I: 4)。含高电子密度脂质颗粒的圆筒形细胞已消失, 但有较多圆筒形细胞的细胞质膜上出现强烈的酶活性反应, 由图版 III 14 可见, 圆筒形细胞的内褶膜上有大量的酶活性反应沉淀颗粒分布, 而在相邻的杯形细胞中很少有酶活性存在, 在较多杯形细胞的细胞质绒毛状突起上, 只在外包质膜上有大块的黑色沉淀物分布, 内含的线粒体中已不见浓集的沉淀颗粒分布(图版 III: 15)。说明只在外包质膜上仍有较强的酶活性分布。

2.2 高浓度氟对中肠 ATP 酶活性的抑制

当食下的桑叶中氟浓度达到 158.9 mg/kg 时, ATP 酶活性已受到严重抑制。在圆筒形细胞的绒毛上只有局部区域还保持较强的酶活性, 大部分区域酶活性反应已很低(图版 I: 5)。内褶质膜上具有很强酶活性的圆筒形细胞中的酶活性消失, 只有少数几个细胞的质膜上有断断续续的黑色沉淀分布(图版 III: 17), 说明细胞质膜上的酶活性已基本消失。当桑叶中氟浓度达到 359.4 mg/kg 时, ATP 酶活性已很弱且分布混乱。圆筒形细胞的绒毛上 ATP 酶活性完全消失, 仅剩细胞内缘部的细胞器膜上还

有少量活性存在(图版 I: 6)。杯形细胞的细胞质膜绒毛状突起上只有散乱分布的细小微弱的反应沉淀物存在(图 18)。圆筒形细胞基底膜面的线粒体、糙面内质网小泡上也有酶的活性反应产生, 细胞核严重变形, 核膜增粗, 核膜及其周围的糙面内质网的酶活性反应沉淀物细小模糊(图版 III: 19)。说明细胞膜的功能已被破坏, 仅剩微弱的酶活性向细胞质扩散。

3 讨论

腺苷三磷酸酶(ATPase)是一种重要的磷酸水解酶, 在动植物细胞膜对离子的吸收、运输和能量转换上起重要作用。氟化物能抑制哺乳动物^[5]和植物组织^[6]中的(Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATP 酶活性。也能抑制桑蚕幼虫消化管的(Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATP 酶的活性^[3]。本研究结果表明, 氟化物不仅抑制桑蚕幼虫中肠 ATP 酶的活性, 而且也影响 ATP 酶活性在亚细胞水平上的分布动态, 特别是在低氟浓度短时间添食时, 氟尚未影响 ATP 酶总活性以前, 已经影响到酶的分布部位。在氟浓度很低时(47.6 mg/kg), 虽然 ATP 酶的总活性仍保持较高的水平, 但是肠壁肌质膜上 ATP 酶的活性已受到抑制, 因此势必影响到肌肉的收缩作用而影响中肠蠕动, 进一步影响中肠对食物的消化吸收, 从而影响幼虫的生长发育。而此时在杯形细胞的细胞质绒毛状突起的外包膜和线粒体中以及含高电子密度颗粒细胞的质膜和胞质上却出现了酶活性反应沉淀颗粒, 具有较高的 ATP 酶活性存在, 推测这可能是由于在轻度氟中毒时的机体排毒的反应, 动用细胞内贮存能量以应付机体由于消化吸收的减少以及解毒生化代谢过程的需要。当氟浓度进一步增高时, 圆筒形细胞的绒毛处 ATP 酶活性直接受到抑制而减弱, 严重影响对食物的消化吸收。而部分圆筒形细胞的 ATP 酶却迅速增强, 并且在各种细胞器如线粒体、内质网、核膜等上都出现 ATP 酶活性, 说明细胞在动用一切能量以对付排毒作用以及维持生命的需要。当然, 过高浓度的氟会全面抑制 ATP 酶的活性, 导致机体不可逆转的瓦解而死亡。因此, 氟化物使桑蚕中肠组织, 特别是分泌消化液、吸收食物营养的重要场所中肠圆筒形细胞绒毛上的 ATP 酶活性的受抑, 是家蚕氟中毒的一种重要的毒理机制。

本试验中观察到的含有大量高电子密度脂质小球的特殊细胞, 与小林正彦^[7]报道的底粒细胞相似, 他认为可能与哺乳类动物的一类分泌细胞相似具有分泌功能。但 King 等^[8]报道, 昆虫中肠圆筒形细胞中具有这种超微形态特征的, 除了一类分泌细胞外, 还有一类具有贮存脂类和糖元等营养物功能的细胞, 当昆虫在饥饿状态时, 这些贮存物被转运到血液中去而消失。从本试验结果看, 当氟浓度增至超出桑蚕安全临界浓度时, 这类细胞的质膜及细胞质中都出现强烈的 ATP 酶活性, 而当氟浓度进一步增高后, 这种细胞就消失。因此, 作者认为桑蚕幼虫中肠的这种特殊细胞可能是一种起暂时贮存过剩营养物的贮存细胞, 而不是分泌细胞。有关这种细胞的确切功能, 有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 陈玉银. 大气氟污染对桑蚕的毒害及防治研究进展. 农牧情报研究, 1993, (2): 36~39
- 2 吕顺霖, 藏荣春, 徐俊良. 氟中毒对家蚕幼虫中肠组织糖元分解代谢调节的影响. 蚕业科学, 1994, 20(2): 110~114
- 3 藏荣春, 吕顺霖. 氟化物对家蚕幼虫中肠(钙、镁)-三磷酸腺苷酶活性的影响. 蚕业科学, 1993, 19(3): 156~161
- 4 朴英杰, 刘连璞, 萧焕才等. 细胞器的电镜酶细胞化学. 中华病理学杂志, 1986, 15(2): 154~158

- 5 Rastogi R. Effect of fluoride on the intestinal epithelial cell brush border membran. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1987, **39**: 162 ~ 167
- 6 Giannini J. The partial characterization of fluoride inhibition of chloroplast coupling factor. Fluoride Chem., 1988, **41**: 79 ~ 93
- 7 小林正彦. 蚕の中腸皮膜にみられる底粒細胞の微細構造. 日蚕雑, 1971, **40**(2): 101 ~ 106
- 8 King R C, Akai H. Insect Ultrastructure. Vol.2. New York and London: Plenum Press, 1984, 205 ~ 211

CYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF ADENOSINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY IN THE MIDGUT TISSUE OF FLUOROSIS SILKWORM *BOMBYX MORI*

Chen Yuyin Bao Huansheng Wu Yucheng

(Zhejiang Agricultural University Hangzhou 310029)

图 版 说 明

图 版 I

氟化钠对圆筒形细胞绒毛上 ATP 酶活性的影响

1. ATP 酶活性反应的对照, 反应液中未加 ATP 钠盐, 没有反应产物。2 ~ 6. 桑叶中氟化物浓度分别为 18.7, 47.6, 99.2, 158.9 和 359.4mg /kg 时的 ATP 酶活性分布。Mv: 微绒毛。

图 版 II

中肠组织的底膜面

7. ATP 酶活性反应的对照, 8 ~ 9. 氟浓度为 18.7 mg /kg 和 47.6 mg /kg 时肠壁肌周围的 ATP 酶分布(箭头所指), 10 ~ 11. 氟浓度为 18.7 kg /mg 时含大量 近圆形黑色颗粒的特殊细胞中没有 ATP 酶分布, 12 ~ 13. 氟浓度为 47.6 mg /kg 时此特殊细胞的细胞质膜及细胞质中都出现强烈的 ATP 酶活性反应(箭头所指)。N: 细胞核, Mc: 肌肉组织, G: 杯形细胞, C: 圆筒形细胞, P: 杯形细胞的细胞质绒毛状突起, gr: 高电子密度的脂质颗粒。

图 版 III

14. 氟浓度为 99.2mg /kg 时部分圆筒形细胞的质膜上出现强烈的 ATP 酶活性反应, 15. 氟浓度为 99.2mg /kg 时杯形细胞绒毛状细胞质突起的 ATP 酶活性分布, 16. 氟浓度为 47.6 mg /kg 时杯形细胞绒毛状细胞质突起的 ATP 酶活性分布, 17. 氟浓度为 158.9 kg /mg 时图 14 圆筒形细胞质膜上的 ATP 酶活性反应物只有断断续续的颗粒分布(箭头所指), 18. 氟浓度达 359.4kg /mg 时杯形细胞的绒毛状细胞质突起中酶活性基本消失, 19. 氟浓度达 359.4 kg /mg 时细胞核严重变形, 核膜及内质网上出现酶活性反应, 但很微弱(箭头所指)。G: 杯形细胞, C: 圆筒形细胞, M: 线粒体, N: 细胞核, er: 内质网。

